

Zárójelentés

Téma címe:

Édesvízi algák által termelt cianotoxinok hatásai vízi gerinctelen szervezetekben - idegrendszeri háttérmechanizmusok *in vivo* és *in vitro* modell rendszereken

Nyilvántartási szám: T63451

Témavezető: Vehovszky Ágnes

Kutatás időtartama: 2005-2009

Az elmúlt évek során a Balatonból izolált cianobaktériumok (elsősorban *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsek) toxicitását mind hazai, mind külföldi kutatócsoportok is vizsgálták, azonban a portugál, német és francia esetekhez hasonlóan a törzsek toxicitását meghatározó hatóanyagokat még nem sikerült azonosítani. Az európai vizekben előforduló *C. raciborskii* toxicitását adó hatóanyagok tehát mindmáig ismeretlenek, a kérdés tisztázására a kutatások még folynak. Számos hasonlóan ellentmondásos eset miatt a cianobakteriális toxicitás kutatásának új irányvonala alakult ki, a bioaktív komponensek szétválasztása nélkül a cianobakteriális szekunder metabolit mátrix hatásmechanizmusának komplex elemzése, az anyagok kölcsönhatásainak feltérképezése.

Az itt bemutatott kutatásaink során a Balatonban megtalálható, potenciálisan toxintermelő kékalgafajok (cianobaktériumok) által termelt hatóanyagok hatásmechanizmusainak minél teljesebb körű feltárását kívántuk elvégezni *in vivo* (gerinctelen szervezetek) és *in vitro* (izolált idegrendszeri preparátumok, sejttenyészetek alkalmazásával). Jellemezni kívántuk a Balatonból történő eseti mintavételezés ill. tömegprodukciók alkalmával izolált cianobaktérium törzsek toxicitási potenciálját, hatásmechanizmusait. Munkánk során *in vivo* toxikológiai tesztek, *in vitro* morfológiai, elektrofiziológiai, biokémiai, módszereket alkalmaztunk. A toxikus komponensek jelenlétét molekuláris genetikai módszerekkel ill. analitikai technikákkal vizsgáltuk.

1. A Balatonból és más vizekből gyűjtött algaminták toxikológiai jellemzése

A balatoni illetve kis-balatoni lokális algavirágzások során a felszínről merítve gyűjtöttünk mintákat, melyekből részben meghatároztuk a számottevő tömegarányban előforduló fajokat, illetve a potenciálisan toxikus törzsek megjelenését akut toxicitási tesztek alkalmazásával állapítottuk meg.

A cianobaktérium tenyészetek toxicitásának vizsgálata során párhuzamosan végeztünk tesztek *Thamnocephalus platyurus* édesvízi rák (THAMNOTOX-F kit, MSZ: 20359/2003 szabvány), *Artemia salina* sórák naupliák alkalmazásával (ArTox), illetve a *Vibrio fischeri* biolumineszcens baktériumra épülő teszt alapján (ToxAlert 100).

A *Vibrio fischeri* teszt biolumineszcencia-gátlás meghatározásán alapuló eljárás: a biolumineszcencia a szervezet életképességének a mutatója, mely toxikus xenobiotikumok jelenlétében csökken. A THAMNOTOX-F, valamint ArTox tesztek során a 24 órás nauplius lárvák életképességének (mortalitásának) dózisfüggő meghatározását végeztük a nyers algakivonatokkal történt 24 órás expozíciót követően, és a minta toxicitását a fél letális koncentráció (LC₅₀ érték) alapján jellemeztük (Finney-féle probit analízis). Irodalmi adatok alapján az a cianobaktérium minta minősíthető toxikusnak, amely 24 órás LC₅₀ értéke nem haladja meg a 20 mg ml⁻¹-t. A terepminták toxikusságát tisztított cylindrospermopszin, és

microcisztin-LR, valamint a cilindropermopszint termelő ausztrál *Cylindropermopsis raciborskii* (AQS, más néven CR3) törzs toxikusságának összehasonlításával minősítettük.

A Balatonból, valamint Kis-Balaton tározóból mindösszesen 10 alkalommal gyűjtött fitoplankton minták közül (**1. táblázat**). három minta esetében észleltünk számottevő toxikus hatást. A siófoki medencében Tihanynál gyűjtött minta *Mycrocystis* fajokat tartalmazott ($LC_{50} = 6,15 \text{ mg ml}^{-1}$), a Kis-Balaton Vízügyi Rendszer felső tározóján (T4-műtárgy) döntően *Mycrocystis* (80%) és kisebb mértékben *Aphanizomenon* sejtek viszonylag homogén eloszlásban voltak jelen, a gyűjtött minta pedig erőteljesen toxikusnak bizonyult ($LC_{50} = 5,35 \text{ mg ml}^{-1}$). A tározó területén egy hónap múlva megismételt gyűjtés során a minta fajösszetétele nem különbözött számottevően az augusztusban gyűjtött anyagtól, de toxicitása kisebb volt ($LC_{50} = 8,43 \text{ mg ml}^{-1}$).

1. táblázat. A Balaton és a Kis-Balaton tározón gyűjtött szeszon fitoplankton minták domináns algafajai (félkövér: toxikus minták)

Gyűjtési időpont	Gyűjtési hely	Domináns fajok
2006.07.04	Siófoki-medence (Tihany, MTA BLKI Kisöböl)	<i>Microcystis</i> sp.
2006.07.10	Keszthelyi-medence (Máriafürdő)	<i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Cyl. raciborskii</i> , <i>Anabaena</i> sp.
2006.08.11	Keszthelyi-medence (tóközép)	<i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Cyl. raciborskii</i> , <i>Oscillatoria</i> sp.
2006.08.24	Szigligeti-medence (Fonyód)	<i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Cyl. raciborskii</i>
2006.09.11	Keszthelyi-medence (Máriafürdő)	<i>Anabaena</i> sp., <i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Cyl. raciborskii</i>
2006.08.22	Kis-Balaton (T4-műtárgy)	<i>Microcystis</i> sp., <i>Aphanizomenon</i> sp.
2006.08.22	Kis-Balaton (Kányavár)	<i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Microcystis</i> sp.
2006.08.22	Kis-Balaton (Pogányvár)	<i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Microcystis</i> sp.
2006.09.22	Kis-Balaton (T4-műtárgy)	<i>Microcystis</i> sp., <i>Aphanizomenon</i> sp.
2006.10.08	Kis-Balaton (T4-műtárgy)	<i>Microcystis</i> sp.,

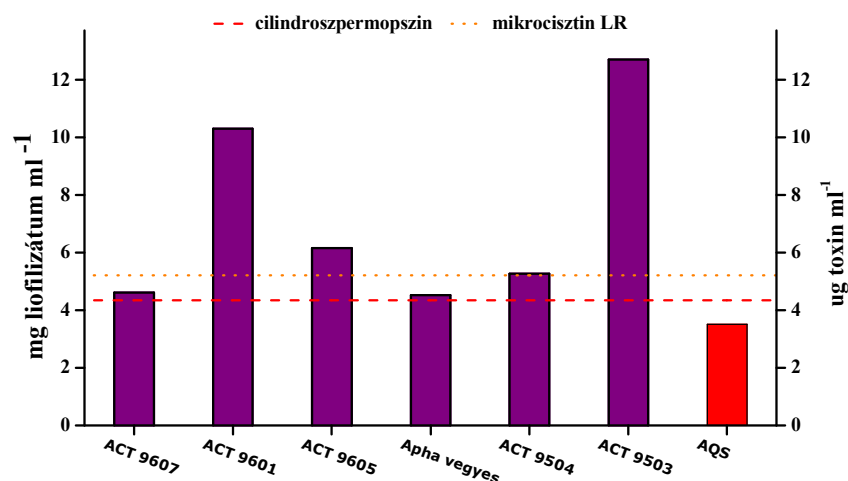
A 2008 június – októberi időszakban havi gyakorisággal vizsgáltuk a Balaton keszthelyi, valamint a tihanyi hajókikötő előtti nyíltvízi területről gyűjtött szeszon minták általános toxicitását. Egyetlen alkalommal észleltünk szignifikáns toxikus hatást a keszthelyi vízminta szeszonjánál ($LC_{50} = 4,2 \text{ mg ml}^{-1}$), ismételt mérés viszont már nem mutatott toxicitást. A Kis-Balaton tározón 2008-ban egy alkalommal észleltünk számottevő fitoplankton tömegprodukción a „Szabari-víz” területén, azonban a szeszon mintákból készített kivonatok a legnagyobb koncentrációban sem fejtettek ki toxikus hatást a ráknaupliákra.

2. Balatonból és más természetes vizekből izolált cianobaktérium törzsek összehasonlító toxikológiai jellemzése

2.1. A Balatonból (Kis-Balatonból) izolált cianobaktérium törzsek toxicitása

A Balaton és a Kis-Balaton tározóiból az évek során izolált cianobaktérium törzsek általános toxicitásának vizsgálata eredményeként hat minta mutatott számottevő toxikusságot. A sórák (*Artemia*) akut toxicitási teszt alapján a Kis-Balatonból izolált *Anabaena spiroides* ACT 9607, valamint a Balatonból izolált *Aphanizomenon flos-aquae* vegyes (nem klónszelektált) tisztaanyag, az *Aphanizomenon flos-aquae* ACT 9605 és a *Cylindropermopsis raciborskii* ACT 9504 tenyészetek bizonyultak erőteljesen toxikusnak (**1.**

ábra). A törzsek toxikussága közel azonos volt a pozitív kontrollként alkalmazott ausztrál *Cylindrospermopsis raciborskii* cianobaktérium (AQS törzs) toxikusságával.



1. ábra. Toxikus cianobaktérium törzsek 24 órás LC₅₀ értéke, összehasonlításban a pozitív AQS kontroll, valamint a tisztított toxinok LC₅₀ értékeivel

2.2. A Balatonból izolált *C. raciborskii* cianobaktérium törzsek összehasonlító toxikológiai vizsgálata

Négy balatoni *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátum (ACT 9502, ACT 9503, ACT 9504, ACT 9505) általános hatását párhuzamosan elemeztük négy ökotoxicitási teszt alkalmazásával. Toxikus referenciaként a bizonyítottan cilindrospermopszint termelő ausztrál *Cylindrospermopsis raciborskii* (AQS), valamint az anatoxinokat (anatoxin-a, homoanatoxin-a) termelő norvég *Oscillatoria formosa* (PCC 6506) cianobaktérium törzsek kivonatait hasonlóképpen teszteltük, mely algakivonatokat azonos módon és időben állítottuk elő.

A toxicitási teszteket (ToxAlert 100, THAMNOTOX-F, ArTox, DAPHTOXKIT FTM) egymással összehasonlítva megállapítható volt, hogy a leggyorsabban értékelhető eredményt (előkészítéssel együtt kevesebb mint 2 óra alatt) a *Vibrio fischeri* teszt adja, a legérzékenyebb eljárás viszont a *Thamnocephalus platyurus* teszt (a letalitási mutatók a µg ml⁻¹ koncentráció tartományban jelennek meg). Utóbbi eljárás alapján a balatoni ACT törzsek toxicitása közötti különbségek is lényegesen jobban kitűnnek (2. táblázat). A legidőigényesebb módszer viszont a *Daphnia magna* teszt, mely kivitelezéséhez három napnál hosszabb idő szükséges (ebből 3 nap a tesztállatok keltetése).

2. táblázat. A cianobaktérium kivonatok toxicitása *Artemia* 24 órás lárváiban

Cianobaktérium törzsek	A toxicitási tesztek EC ₅₀ /LC ₅₀ értékei			
	[átlag ± szórás]			
	Toxalert 100	TamnoTox F	ArTox	DaphTox F tm
	[mg ml ⁻¹]	[µg ml ⁻¹]	[mg ml ⁻¹]	[mg ml ⁻¹]
ACT 9502	4,3 ± 1,1	9,4 ± 4,4	4,2 ± 0,7	0,92±0,1
ACT 9503	3,7 ± 0,8	37,5 ± 17,7	4,5 ± 1,1	2,3±0,5
ACT 9504	1,25 ± 0,9	7,4 ± 2,5	2,7 ± 0,6	2,2±0,3
ACT 9505	5,4 ± 1,2	75 ± 35,4	5,8 ± 1,2	4,2±0,7
PCC 6506	0,89 ± 0,41	6,4 ± 2,7	2,4 ± 0,5	1,3±0,2
AQS	0,17 ± 0,05	2,9 ± 0,9	0,23 ± 0,03	0,11±0,05

Mind a négy *bioassay* vizsgálat azt mutatta, hogy a legnagyobb toxicitást az AQS törzs nyers kivonata fejtette ki. *Artemia* (Artox) tesztekben például az AQS kivonat mintegy nagyságrenddel erőteljesebbnek bizonyult ($EC_{50} = 0,23 \pm 0,03$ mg alga liofilizátum ml^{-1}) mind a balatoni törzsek, mind a neurotoxinokat termelő PCC törzsszel szemben. A neurotoxinokat termelő PCC törzs hatásával közel azonos nagyságrendben ($EC_{50} = 2,4 \pm 0,5$ mg ml^{-1}) mértük a balatoni *Cylindrospermopsis raciborskii* törzsek toxicitását. Az egyes balatoni törzsek kivonatainak toxicitási mutatói szerint a következő hatássorrend állapítható meg: ACT 9504 > ACT 9502 > ACT 9503 > ACT 9505 ($EC_{50} = 2,7 \pm 0,6$; $4,2 \pm 0,7$; $4,5 \pm 1,1$; $5,8 \pm 1,2$ mg ml^{-1}).

Megközelítőleg ugyanez a sorrendiség figyelhető meg a többi teszt faj esetében is, és mivel nagyságrendi különbségek nem mérhetőek a toxicitási értékekben, a kisebb-nagyobb eltéréseket nem tekinthetjük relevánsnak. A különbségek betudhatóak a fajok különböző érzékenységeinek, de a teszttálatok aktuális kondíciójának is. Jellemző, hogy a teszt fajok a pozitív kontrollként alkalmazott alfafajok kivonataira közel azonos mértékben reagáltak.

Az *Artemia salina* és a *Daphnia magna* tesztek érzékenysége a *Vibrio fischeri* módszerével hasonló (Toxalert EC_{50} értékei 30 perces expozíció után közel azonos értékeket adtak), vagyis, ha csak az általános toxikus hatás megállapítása a cél, a Toxalert alkalmasabbnak tűnik. Az *Artemia* sórak naupliák bevonása további *bioassay* vizsgálatokba azonban egy nagyon fontos előnyt is jelent, ugyanis a vizsgálati (1 ml) térfogatban akár 100 egyed is kezelhető, és a letalitási tesztet túlélő egyedekből készült szövetmintákból biokémiai vizsgálatok (biomarker enzimszint mérések) közvetlenül elvégezhetőek, mint az alábbi eredmények is igazolják.

2.3. A cianobaktérium törzsek nyers kivonatainak összehasonlítása *in vivo*- kísérletekben biokémiai marker enzimek vizsgálatok alapján

A sórak (ArTox) tesztekben életben maradt egyedek egésztest-homogenizátumából készült mintákat további, biokémiai vizsgálatoknak vetettük alá, melyek során a cianobaktériális szekunder metabolitok hatását egyes, az ökotoxikológiai vizsgálatokban alkalmazott marker enzimek (GST, LDH, AchE) szintjének megváltozásában mértük (3. táblázat). A glutation-S transzferáz (GST) enzim xenobiotikumok biotranszformációjában (detoxifikációs folyamataiban) szerepel, a laktát dehidrogenáz (LDH) enzim szintje a sejt-és szövet, illetve a metabolikus aktivitás károsodása esetén emelkedik, míg az acetilkolin észteráz (AchE) enzim gátlása potenciális neurotoxikus hatások jelenlétére utalhat.

3. táblázat. A cianobaktérium kivonatok hatása a biokémiai marker enzimek szintjére *Artemia* 24 órás lárváiban (↑ aktivitás növekedés, ↓ aktivitás csökkenés).

Cianobaktérium törzsek	GST aktivitás (EC_{50}) [mg ml^{-1}]	LDH aktivitás (EC_{50}) [mg ml^{-1}]	AChE aktivitás (EC_{50}) [mg ml^{-1}]
ACT 9502	↑ 3,46	↑ 0,70	↓ 2,87
ACT 9503	–	↑ 1,95	–
ACT 9504	↑ 2,32	↑ 0,97	↓ 1,53
ACT 9505	–	↑ 2,88	–
PCC 6506	↑ 1,93	↑ 0,49	↓ 1,94
AQS	↓ 0,41	↑ 0,07	–

Az *in vivo* mortalitási tesztek eredményeivel összhangban a legtoxikusabbnak a cylindrospermopsint termelő AQS törzs nyers kivonata bizonyult, ez okozta a legjelentősebb

LDH aktivitásnövekedést a kezelt állatok homogenizátumában. Az anatoxinokat tartalmazó PCC 6506 kivonat kevésbé, de az ACT törzsekhez viszonyítva mégis toxikusabbnak bizonyult. A balatoni *Cylindrospermopsis* törzsek mindegyike szintén okozott LDH szint növekedést, ennek maximális szintjét a legalacsonyabb (1 mg ml^{-1}) koncentrációban az ACT 9504 kivonat idézte elő, míg – ahogy az a mortalitás adatokból is látszik az ACT 9505 törzs kivonata volt a legkevésbé hatásos.

Minden balatoni *C. raciborskii* törzs nyers kivonata szignifikáns, dózisfüggő GST aktivitásnövekedést okozott a sórak lárvákban. A mortalitási eredményekkel összhangban leghatásosabbnak szintén az ACT 9504, legkevésbé pedig az ACT 9505 törzsek kivonata bizonyult. A PCC 6506-os törzs hatásossága minden ACT kivonat hatását felülmúlta, míg AQS törzs nyers kivonata koncentrációfüggő módon először növekedést, majd nagyobb koncentrációban GST szint csökkenést váltott ki a teszttalatok szöveteiben, ami az AQS által termelt cilindrospermopszin (az ACT ill. PCC törzsek hatóanyagától) eltérő hatásmechanizmusra utal. *Artemia* szövetekben a GST enzimaktivitás hasonló bifázisos változása mérhető ki mitokondriális complex I. gátló neurotoxinok alkalmazásával, amelyek a sejtlégzés során képződő aktív gyökök szintjének megnövekedése révén váltják ki intracelluláris károsító hatásukat.

A rák naupliák acetilkolinesteráz (AChE) aktivitását a balatoni *C. raciborskii* ACT 9504 kivonata gátolta legnagyobb mértékben, ami a cianobaktériumok által termelt hatóanyagok neurotoxikus hatását jelzi. A balatoni ACT 9503 és ACT 9505 törzsek kivonatai nem váltottak ki szignifikáns hatást, míg a referenciatörzsek közül az anatoxinokat tartalmazó PCC kivonat az ACT 9504 kivonathoz hasonlóan gátolta az AChE aktivitást. A cilindrospermopszint tartalmazó AQS kivonata hatástalan volt az acetilkolinesteráz szintjére.

2.4. A cianobaktérium törzsek nyers kivonatainak neurotoxikus hatásai puhatestűek idegrendszerében

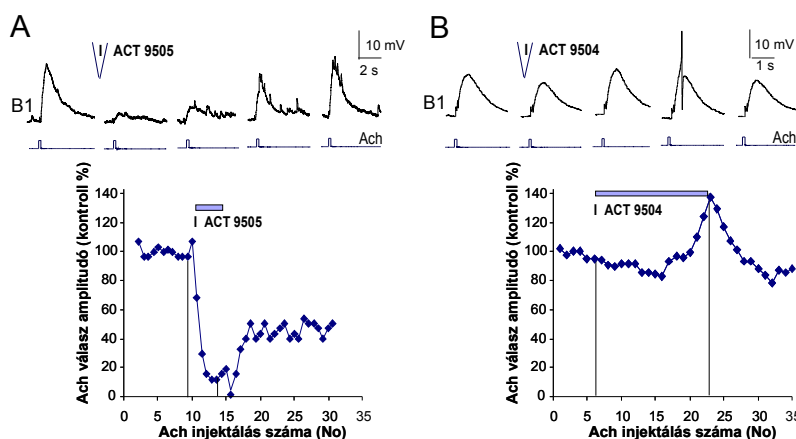
2.4.1. *Lymnaea stagnalis* viselkedési tesztek

Lymnaea lokomóciós teszteket elsőként PCC 6505 törzs liofilizált kivonatával végeztünk, kontrollként egy zöldalga (*Selenastrum*) hasonlóképpen előállított kivonata szolgált. Az eddigi adatok szerint a spontán lokomócióban nem tapasztalható szignifikáns változás az algatkivonatokkal kezelt csoportok között, de kismértékű, gyorsan lezajló csökkenést tapasztaltunk a PCC törzs által is termelt anatoxin-a $1 \mu\text{M}$ oldatának jelenlétében. Értékelésünk szerint az anatoxin-a módosíthatja – csökkenti a spontán mozgást, az algakivonatok viszont nem hatásosak az állat mozgásaktivitásának szignifikáns megváltoztatására. Ennek magyarázata lehet, hogy az algakivonat egyben táplálékul szolgál az állatok számára, és a táplálkozás során megnövekszik az állat általános ingerlékenységi állapota (arousal). A táplálkozás során az általános ingerlékenység növekedésével a mozgásaktivitás is növekszik, és ez feltehetően ellensúlyozza (az alkalmazott koncentrációban) az algakivonatok spontán mozgást csökkentő hatását.

2.4.2. Elektrofiziológiai tesztek izolált idegrendszeri preparátumokon

A viselkedési vizsgálatok eredményeivel ellentétben izolált idegrendszeri preparátumokon a vizsgált algakivonatok jól körülírható hatásait sikerült megfigyelnünk. *Helix pomatia* ill. *Lymnaea stagnalis* központi idegrendszeri azonosított neuronjain folytattuk a Balatonból izolált cianobaktérium, *C. raciborskii* algatörzsek (ACT 9502, 9503, 9504, 9505), *Aphanizomenon* vegyes állomány, illetve anatoxin-a neurotoxin tartalmú (*Oscillatoria*, PCC 6505) és a cilindrospermopszin hepatotoxint tartalmazó (*Cylindrospermopsis raciborskii* AQS) törzsekből sejtlízis útján készített nyers algakivonat vizsgálatát.

A balatoni ACT törzsek kivonatai, lényegében azonos dózisfüggő, kompetitív és közel reverzibilis gátló hatást fejtettek a lokális acetilkolin-válaszra, a legerősebb gátlást az ACT 9505 törzs kivonatának jelenlétében tapasztaltuk (2. ábra A.), és a fentiekhez hasonló, dózis- és időfüggő gátlást váltott ki a kereskedelembe kapható anatoxin-a valamint a PCC-minták kivonata is. Egyes minták (pl. ACT 9504) jelentésében ugyanakkor a gátlás mellett hosszabb időtartamú perfúzió során a sejt ingerlékenysége ill. kolinerg válasz erőssége időlegesen megnőtt, feltételezve egyéb, a neuronmembránra ható mechanizmusok működését is (2. ábra B). Hasonló hatást a kereskedelembe kapható kolineszteráz blokkolókkal (physiostigmin, neostigmin) esetenként szintén sikerült kiváltanunk. Az algakivonatok hatására néhány esetben (ACT 9505, ACT 9502, *Aphanizomenon* vegyes állomány) megfigyelhető volt a spontán aktivitás megváltozása, a sejtre érkező szinaptikus bemeneteket aktivizáló, ritmikus aktivitásmintázatot kiváltó közvetett hatás is, mely a táplálkozási ill. légzési mintázatgeneráló rendszer kiváltott működését jelzi.



2. ábra A. Lokálisan applikált acetilkolin membránhatásának reverzibilis gátlása ACT 9505 törzs kivonatának hatására **B.** ACT 9504 kivonat jelenlétében a gátlást követően időlegesen megnő az ACh válasz amplitúdója, mely akciós potenciált is generálhat.

Az eredmények alapján a Balatonból izolált algatörzsekben egyrészt az acetilkolin-választ gátló, anatoxin-a jellegű hatással rendelkező bioaktív anyagok vannak jelen, de nem zárhatjuk ki, hogy egyes törzsek kivonatában többféle (pl. az ACT 9504 mintában AchE aktivitást gátló) komponens is részt vesz a neurotoxikus hatás kialakításában. A cilindropermopszint termelő AQS törzs kivonata hasonló neuronális hatásokat nem fejtett ki (negatív kontroll).

2.5. A cianobaktérium törzsek nyers kivonatainak összehasonlítása in vitro - kísérletekben CHO-K1 sejtenyészetben életképesség változás alapján

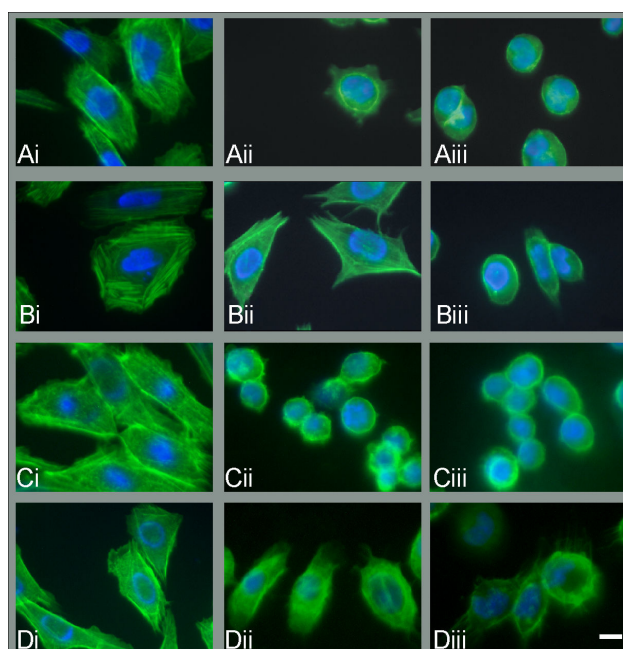
In vitro modellen, CHO-K1 sejtenyészetben a négy balatoni *Cylindropermopsis raciborskii* nyers kivonatának dózisfüggő hatását elemeztük 3- ill. 24 órás expozíciót követően, LDH enzimszint mérések alapján. A megfigyelések a balatonból izolált egyes törzsek további különbségeire is fényt derítettek. Rövid idejű (3 órás) kezelést követően az ACT 9505 törzs kivonata, 24 órás expozíciót követően az ACT 9504 bizonyult legtoxikusabbnak, míg az ACT 9502 törzs csak 24 óra múlva mutatott szignifikáns károsító hatást a CHO-K1 sejtekre. A referencia mintaként szolgáló AQS törzs kivonatának erőteljes károsító hatása nagyrészt lezajlott az akut (3 órás) expozíció során. Az ACT törzsek kivonatainak hatásosságát (EC_{50} értékeket) összehasonlítva (4. táblázat) a rövid- és hosszútávú toxicitás különbségei a különböző ACT törzsek kivonatainak különböző hatásmechanizmusaira, esetleg egymástól eltérő bioaktív komponensek jelenlétére is utalhatnak.

4. Táblázat. A cianobaktérium kivonatok toxicitása CHO-K1 sejteken

Cianobaktérium törzs	EC ₅₀ érték – 3 óra (mg algatömeg ml ⁻¹)	EC ₅₀ érték – 24 óra (mg algatömeg ml ⁻¹)
ACT 9502	---	7,21
ACT 9503	20,2	11,0
ACT 9504	16,4	0,65
ACT 9505	7,4	1,51
AQS	0,74	---

2.6. A cianobaktérium törzsek nyers kivonatainak összehasonlítása in vitro - CHO-K1 sejtenyészetben kiváltott morfológia (citoszkeleton szerkezet) változások

A cianobaktérium kivonatok lehetséges citotoxikus-genotoxikus hatását a sejt alakjában, intracelluláris vázrendszerében bekövetkező morfológiai változások alapján, 24 órás kezelés után az aktinfilamentumok festésével vizsgáltuk. Az inkubációt követően az ACT 9502 törzs kivonata okozta az intracelluláris aktin filamentumok megjelenésére kifejtett legerőteljesebb hatást, előidézve a sejt intracelluláris szerkezetének drasztikus összeomlását, ennek eredményeként a sejtest jól megfigyelhető zsugorodását (**3. ábra**). A toxikus hatás következtében deformálódott, gyengébben letapadt sejtek megjelenése hasonlóan megfigyelhető volt mindegyik általunk vizsgált ACT törzs kivonatának alkalmazását követően, különbséget az azonos hatás eléréséhez szükséges küszöb koncentrációk (1-2 mg ml⁻¹) mutatták. Legkevésbé az ACT 9503 törzs tekinthető citotoxikusnak, mivel látható változásokat csak 2 mg ml⁻¹ koncentráció felett váltott ki. A referenciaként alkalmazott AQS kivonata hasonló, de jóval erőteljesebb citotoxikus hatását a degeneratív morfológiai változásokhoz szükséges alacsonyabb (0,5 mg ml⁻¹) küszöb koncentráció bizonyítja, melyhez hasonló változásokat tisztított (2-5 µM) cilindrospermopszin kezeléssel is előidézhattunk.



3. ábra Cylindrospermopsis raciborskii törzsek kivonatainak morfológiai hatásai CHO-K1 sejtek 24 órás kezelését követően. Ai, Bi, Ci, Di, kontroll sejtek A.: ACT 9502, B.: ACT 9503, C.: ACT 9504, D.: ACT 9505 törzs kivonata, 1 mg ml⁻¹ (Aii, Bii, Cii, Dii) és 2 mg ml⁻¹ (Aiii, Biii, Ciii, Diii) koncentráció. Kalibrálás=10 µm.

3. A cianobaktériumok által termelt bioaktív anyagok viselkedés-élettani hatásai egy balatoni amphipoda rákon - *Dikerogammarus villosus* – környezeti kockázatbecslés

A balatoni cianobaktériumok esetleges tömegprodukciója során felmerülő környezeti kockázat becslésére vizsgáltuk a négy balatoni *C. raciborskii* törzs nyers kivonatának hatását egy Balatonból gyűjtött amphipoda rákfajon (*Dikerogammarus villosus*). A 48 ill. 96 órás kezelés során alkalmazott cianobaktérium szuszpenziók (10- ill., 20 mg l⁻¹ alga liofilizátum) a 200- 400 µg l⁻¹ klorofill-a tartalomnak megfelelő mennyiségek. Hasonló értékek a Balatonon 1994-95-ben mért *Cylindrospermopsis* tömegprodukciók alkalmával voltak kimérhetőek, vagyis a 10 mg l⁻¹-es dózis a balatoni *C. raciborskii* tömegprodukcióval megegyező állapotnak felel meg. Pozitív referenciaként ez esetben is a cilindrospermopszint termelő AQS és a neurotoxinokat termelő PCC 6506-os törzs nyers kivonatait alkalmaztuk a balatoni mintákkal megegyező koncentrációban.

Viselkedés-élettani kísérletekben a *Dikerogammarus* rákok spontán mozgását (adott idő alatt leúszott táv hosszát) illetve a légzőnyílások oxigénellátását biztosító vízáramlást fokozó „légzőmozgásban” szerepet játszó potrohláb (pleupódium) mozgásának frekvenciáját mértük a 48 és 96 órás expozíciót követően. Az ACT 9502 és ACT 9504 kivonatok jelenlétében mind a spontán mozgás (úszás aktivitása), mind a pleupódium mozgásának frekvenciája kismértékű (max 20%), szignifikáns csökkenést mutatott, míg az ACT 9505 illetve AQS törzsek kivonatai nem okoztak változást.

A kivonatok biokémiai (anyagszere) folyamatokra kifejtett hatását az *Artemia* tesztekhez hasonlóan a három biokémiai végpont – GST, LDH, AChE – változásai alapján értékeltük, melyeket egésztest homogenizátumban végeztük, egyedenkénti feldolgozásban (5. táblázat).

5. táblázat. Biokémiai marker enzimek aktivitása *Dikerogammarus* homogenizátumában cianobakteriális kivonatok hatására (↑ aktivitás növekedés, ↓ aktivitás csökkenés).

Cianobaktérium törzsek	GST aktivitás [kontroll %]		LDH aktivitás [kontroll %]		AChE aktivitás [kontroll %]	
	10 mg l ⁻¹	20 mg l ⁻¹	10 mg l ⁻¹	20 mg l ⁻¹	10 mg l ⁻¹	20 mg l ⁻¹
Expozíció [96 h]						
ACT 9502	↑ 15%	↑ 21%	↑ 82%	↑ 100%	↓ 9%	↓ 17%
ACT 9503	↑ 11%	↑ 12%	↑ 63%	↑ 170%	–	↓ 11%
ACT 9504	↑ 17%	↑ 27%	↑ 97%	↑ 290%	↓ 17%	↓ 26%
ACT 9505	–	↑ 8%	↑ 33%	↑ 48%	–	–
AQS	↑ 13%	↑ 17%	↑ 98%	↑ 550%	–	–
PCC 6506	–	↑ 26%	↑ 43%	↑ 240%	↓ 9%	↓ 24%

A kísérletekben alkalmazott koncentrációk egyik esetben sem okozták a kísérleti állatok pusztulását, vagyis a biokémiai eredmények szubletális dózissnak megfelelő változásokat tükröznek.

A GST aktivitás szignifikánsan csak a 20 mg l⁻¹ kezelési koncentrációnál nőtt meg a kezelt állatokban mind a balatoni (ACT 9502, ACT 9504), ill., a PCC 6506-os törzsek kivonatai hatására. Az AQS kivonat csekély aktivitásnövekedést okozott, ami látszólag ellentétes az *Artemia* ökotoxicitási tesztekben kapott eredményekkel. Ismerve viszont a GST szint dózisfüggését (nő, majd csökken a GST aktivitás), az AQS hatásában ill. GST szintben mért különbségének magyarázata, hogy *Artemia* esetén toxikus koncentrációkat teszteltünk,

míg a *Dikerogammarus* kísérletek szubletális (természetes állapottal közel megegyező) dózisban történtek. Az állatokban az *Artemia*-teszt eredményekkel megegyezően minden balatoni algakivonat, legerőteljesebben az ACT 9504 törzs okozott számottevő LDH aktivitásnövekedést, míg az ACT 9505-ös törzs bizonyult a legkevésbé károsnak. Ugyancsak az *Artemia* eredményekkel összhangban, az ACT 9504, valamint PCC 6506-os törzsekkel kezelt rákok szöveteiben mérhettük legnagyobb mértékben az acetilkolineszteráz enzim gátlását is. Az ACT 9504 és ACT 9502, valamint PCC törzsek hatására megfigyelt szignifikáns AchE aktivitás csökkenés (**5. táblázat**) korrelációt mutatott a rákok spontán mozgásában megfigyelt csökkenésével jelezve a kivonatokban acetilkolineszteráz gátló neurotoxikus komponens jelenlétét.

A Balatonon eddig előfordult tömegprodukciót a fenti kísérletsorozatban modellezve megállapíthattuk, hogy az algavirágzásnak megfelelő koncentrációban alkalmazott balatoni *C. raciborskii* algakivonatok, de még a bizonyítottan toxintermelő (AQS, PCC) törzsek sem okozzák a tesztállatok mortalitását, viszont szubletális változásokat (viselkedési és biokémiai válaszreakciókat) idéznek elő.

A modellként alkalmazott planktonikus rákszervezetek (*Thamnocephalus platyurus*, *Artemia salina*, *Daphnia magna*), valamint az amphipoda (*Dikerogammarus*) rákkal végzett bioesszé toxicitási tesztek szoros korrelációja azt mutatja, hogy az *Artemia*-teszteken alapuló toxicitási vizsgálatok eredménye alkalmas lehet *in situ* cianobakteriális tömegprodukció kockázatbecslésére az édesvízi amphipoda ill. planktonikus rákok tekintetében is.

4. A cianobaktériumok által termelt bioaktív komponensek hatóanyagainak minőségi és mennyiségi elemzése

4.1. A balatonból izolált törzsek cilindrospermopszin termelő képességének molekuláris vizsgálata

A Balatonból izolált *C. raciborskii* törzsekből és nyári fitoplankton mintákból nem volt detektálható a cilindrospermopszin termelésért „felelős” PS és PKS génpár, ellentétben a toxikus AQS (CR3) kontrollal. Megállapítható tehát, hogy a balatoni *C. raciborskii* – hasonlóképpen az európai (német, portugál, francia) vizekből izolált törzsekhez – nem termel cilindrospermopszint.

4.2. A cianobaktériumok által termelt bioaktív anyagok hatóanyagok analitikai vizsgálatai

Az ökotoxikológiai vizsgálatokban alkalmazott cianobaktérium kivonatok analitikai összetételét ESI LC/MS és MALDI-TOF/MS tömegspektrometriai módszerekkel vizsgáltuk. A két eljárást a vizes kivonatokban található komponensek fajlagos tömeg szerinti elválasztására, valamint szerkezetük meghatározására alkalmaztuk. Az ismert cianotoxinok azonosítása és mennyiségi meghatározása részben standard (kereskedelemben kapható) toxinok alkalmazásával, ill. a tömegspektrumok irodalmi adatokkal való összehasonlítása alapján történt.

A vizes kivonatokban detektált komponensek döntő többsége (60 – 80%) a 100 – 400 Da molekulatömeg tartományban adódott (**6. táblázat**). A kivonatok összetételében, genuson belül számottevő volt az azonos komponensek száma és relatív mennyisége. Ezt a balatoni *C. raciborskii* ill. AQS törzsek kivonatában a mintegy 65 – 75%-os komponens azonosság igazolja. A minták között leginkább a PCC 6506 törzs különül el, amelynél a nyers kivonatban mintegy 27 db. specifikus komponens detektáltunk az összesen 30 db. komponens közül.

6. táblázat. A cianobaktériumok nyers kivonataiban detektált molekulák ill., molekula fragmentumok mennyiségi áttekintése

Molekula ill. molekula fragmentumok száma	ACT 9504	ACT 9505	AQS	Apha v.	PCC 6506
Összesen	35	31	32	10	30
Azonos komponensek	6				
	24				
Specifikus komponensek	3	1	6	3	27
Azonosított molekulák	3	2	3	2	3

Az ismert cianotoxinok közül cilindrospermopszint kizárólag az AQS törzs nyers kivonatában mutattunk ki ($12,7 \text{ mg g}^{-1}$), míg anatoxinokat egyedül a PCC 6506 törzs kivonatában mértünk (anatoxin-a $124 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, homoanatoxin-a $3,2 \text{ mg g}^{-1}$). A balatoni *C. raciborskii* és *Aphanizomenon* sp. kivonataiban egyetlen ismert cianotoxin sem volt kimutatható.

Irodalmi adatok alapján a nyers kivonatokban még három komponens azonosítása történt meg: a fenilalanin (hidrofil aminosav), valamint feofitin és feoforbid (7. táblázat). Utóbbi két komponens a klorofill-a alakjai, amelyek a fényenergia kémiai energiává alakításában vesznek részt.

7. táblázat. A cianobaktériumok nyers kivonatában azonosított hidrofil komponensek relatív intenzitása.

Komponens	Molekulatömeg [M + H]	Relatív intenzitás [abszorbancia egység]					Megjegyzés
		ACT 9504	ACT 9505	AQS	Apha v.	PCC 6506	
fenilalanin	166	63	24	18	80	22	esszenciális aminosav
feofitin	870	648	61	935	532	1354	pigment
feoforbid	592,4	23	-	33	-	604	pigment

A Balatonból izolált *C. raciborskii* törzsek analitikai vizsgálatai ugyanakkor nem igazolták az eddig ismert cianotoxinok (cilindrospermopszin, anatoxin-a, anatoxin-a(s) vagy szaxitoxinok) jelenlétét.

5. Összefoglaló, következtetések

A gyűjtött terepminták és laboratóriumban fenntartott izolált alga törzsek toxikológiai elemzése bizonyította, hogy sporadikusan mind a Balatonban mind a Kis-Balaton területén megjelenhetnek toxicitást mutató alga törzsek. A Balatonból származó *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumok ACT 9504 törzse bizonyult legkínakb, az ACT 9505 törzs legkevésbé toxikusnak *in vivo* bioesszé (ToxAlert 100, THAMNOTOX-F, ArTox, DaphTox F) és a kezelt állatok homogenizátumából mért biomarker (LDH) enzimszint növekedése alapján. A cilindrospermopszint tartalmazó *C. raciborskii* (AQS) referenciatörzs toxikussága még erőteljesebb volt, de biokémiai mérések (ellentétes GST szint változás, AchE aktivitás gátlás hiánya) valószínűsítik az eltérő hatásmechanizmust az ausztrál és balatoni törzsek között. Az anatoxinokat tartalmazó *Oscillatoria* (PCC 6505) törzs a mért biokémiai paraméterekben (LDH, GST szintek, AchE gátlás) hasonlóan hatott mint az ACT kivonatok. Puhatestű

neuronokon végzett elektrofiziológiai tesztek a balatoni *C. raciborskii* törzsek közül neurotoxikus hatásokat leginkább az ACT 9505 és ACT 9504 törzsek esetén mutattak ki. Az ACT 9505 kivonat kolinerg receptorblokkoló hatása az anatoxinokat szintetizáló PCC törzshöz hasonlít, míg az ACT 9504 törzs (viselkedési és biokémiai tesztekkel megegyezően) AchE gátló hatásmechanizmusa feltételezhető. *In vitro*, CHO-K1 sejtenyészen végzett biokémiai és a sejtvázszerkezetében kialakuló degeneratív változások rövid- és hosszútávú (eltérő bioaktív komponensek vagy mechanizmusok) révén kialakuló citotoxikus hatásokat is mutatnak.

A Balatonon eddig előfordult tömegprodukciónak megfelelő koncentrációban alkalmazott *C. raciborskii* algakivonatok nem okoznak mortalitást, de szignifikáns biokémiai változásokat váltanak ki. Az egyes balatoni cianobaktérium kivonatok hasonlóan hatnak mindkét (*Artemia*, *Dikerogammarus*) kísérleti állatban a mért biomarker enzimek szintjére, vagyis az *Artemia*-teszteken alapuló toxicitási vizsgálatok eredménye alkalmas lehet a Balatonban élő alacsonyabbrendű rákszervezetek toxikológiai kockázatbecslésére is.

Molekuláris genetikai vizsgálatok szerint a balatoni *C. raciborskii* törzsek nem termelnek cilindropermopszint, és analitikai vizsgálatok sem igazolták eddig ismert cianotoxinok (anatoxin-a, anatoxin-a(s) vagy szaxitoxinok) jelenlétét. Az *in vivo* és *in vitro* tesztek szerint mérhető toxicitás így feltehetően egyéb, eddig nem azonosított toxikus hatású metabolitok jelenlétének, esetleg ezek szinergista hatásának köszönhetőek.